

10/530790

PCT/JP03/13166

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

15.10.03

RECEIVED

04 DEC 2003

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年10月15日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-300959  
[ST. 10/C]: [JP2002-300959]

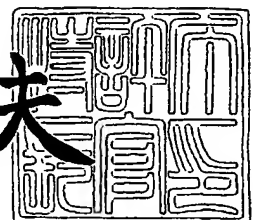
出 願 人  
Applicant(s): アークレイ株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 R6978

【提出日】 平成14年10月15日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07C 15/27  
G01N 33/70

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ  
株式会社内

【氏名】 小坂 秀子

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000040

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【電話番号】 06-6135-6051

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 139757

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0107559

【プルーフの要否】 要

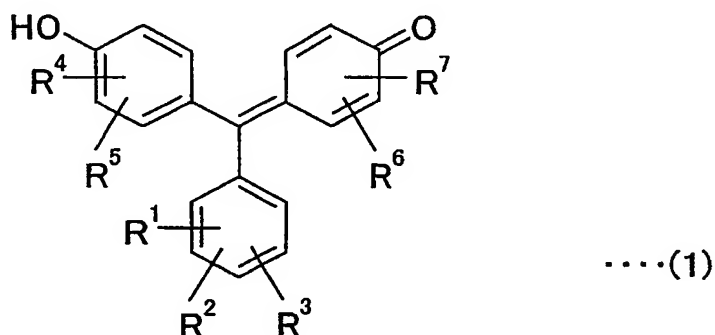
【書類名】 明細書

【発明の名称】 クレアチニン測定用試験片

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式(1)で表わされる化合物を含むクレアチニン測定用試験片。

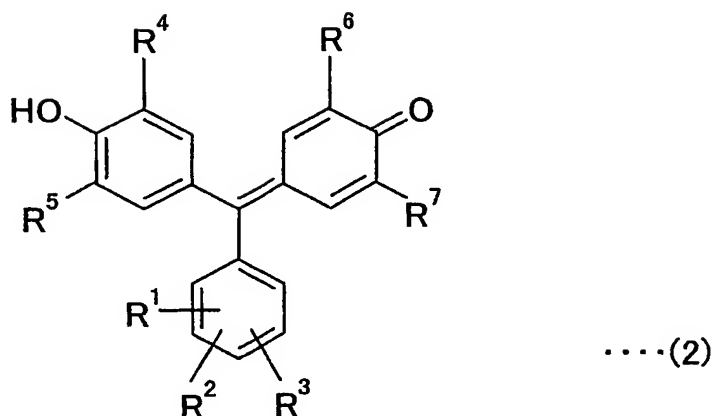
【化1】



前記式(1)において、 $R^1$ は、 $H$ 、 $SO_3X$ 、 $COOX$ であって、 $R^4$ および $R^6$ は、 $OH$ 、 $SO_3X$ 、 $COOX$ であり、それぞれ同一であっても異なってもよく、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ および $R^7$ は、 $H$ 、 $OH$ 、 $Cl$ 、 $Br$ 、 $I$ 、 $NO_2$ 、 $NO$ 、 $CH_3$ であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記 $R^1$ 、 $R^4$ および $R^6$ における $X$ が、 $H$ 、 $Na$ 、 $K$ 、 $NH_4$ であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。

【請求項2】 前記化合物が、下記式(2)で表わされる化合物である請求項1記載のクレアチニン測定用試験片。

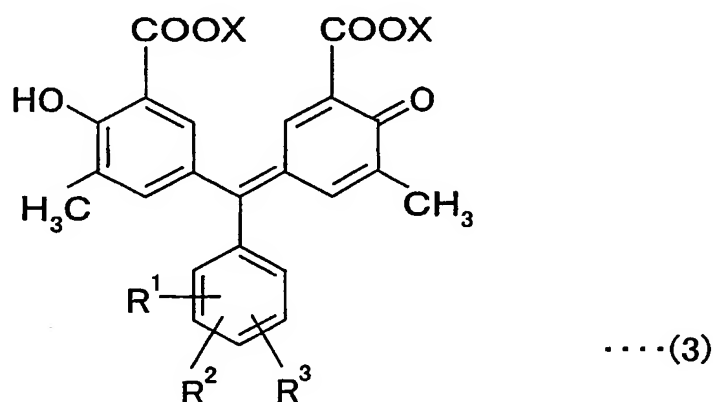
## 【化2】



前記式(2)において、 $R^1$ は、 $H$ 、 $SO_3X$ 、 $COOX$ であって、 $R^4$ および $R^6$ は、 $OH$ 、 $SO_3X$ 、 $COOX$ であり、それぞれ同一であっても異なってもよく、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ および $R^7$ は、 $H$ 、 $OH$ 、 $Cl$ 、 $Br$ 、 $I$ 、 $NO_2$ 、 $NO$ 、 $CH_3$ であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記 $R^1$ 、 $R^4$ および $R^6$ における $X$ が、 $H$ 、 $Na$ 、 $K$ 、 $NH_4$ であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。

【請求項3】 前記化合物が、下記式(3)で表わされる化合物である請求項2記載のクレアチニン測定用試験片。

## 【化3】

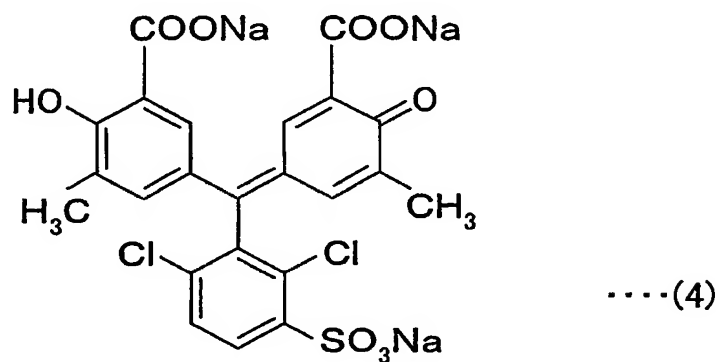


前記式(3)において、 $R^1$ は、 $H$ 、 $SO_3X$ 、 $COOX$ であって、 $R^2$ および $R^3$ は、 $H$ 、 $OH$ 、 $Cl$ 、 $Br$ 、 $I$ 、 $NO_2$ 、 $NO$ 、 $CH_3$ であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記 $X$ が、 $H$ 、 $Na$ 、 $K$ 、 $NH_4$ であって、

それぞれ同一であっても異なってもよい。

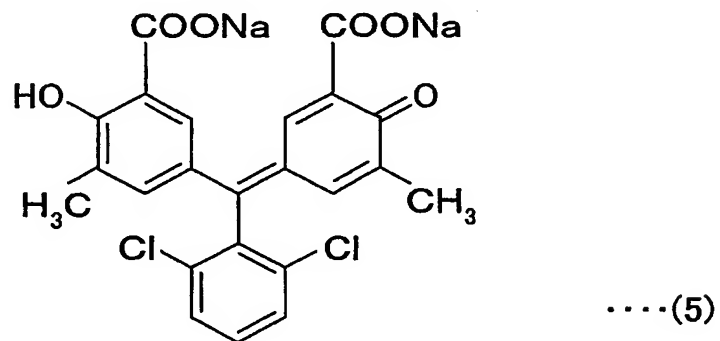
【請求項 4】 前記化合物が、下記式（4）で表わされる化合物である請求項 1 記載のクレアチニン測定用試験片。

【化 4】



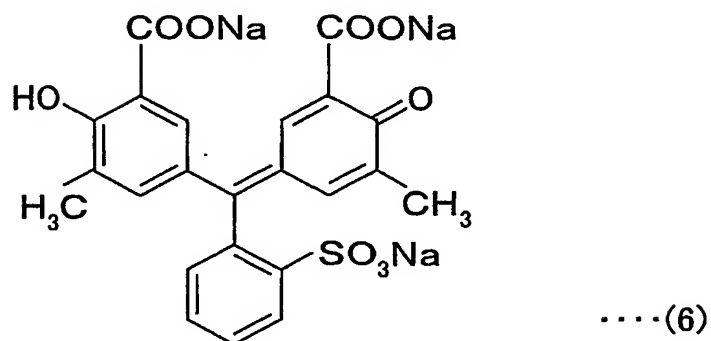
【請求項 5】 前記化合物が、下記式（5）で表わされる化合物である請求項 1 記載のクレアチニン測定用試験片。

【化 5】



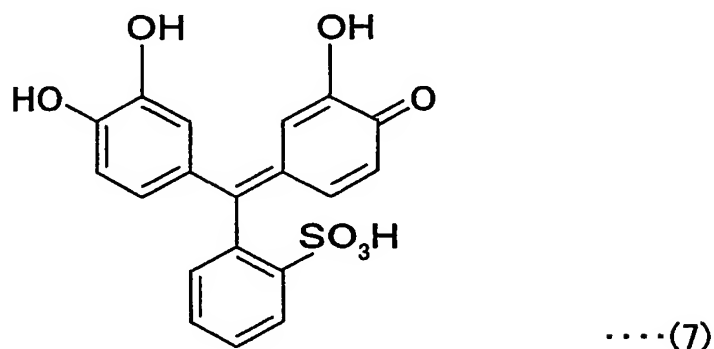
【請求項 6】 前記化合物が、下記式（6）で表わされる化合物である請求項 1 記載のクレアチニン測定用試験片。

## 【化6】



【請求項7】 前記化合物が、下記式（7）で表わされる化合物である請求項1記載のクレアチニン測定用試験片。

## 【化7】



【請求項8】 さらに、前記化合物と呈色錯体を形成する金属またはその塩を含有する請求項1～7のいずれか一項に記載のクレアチニン測定用試験片。

【請求項9】 前記金属が遷移金属である請求項8記載のクレアチニン測定用試験片。

【請求項10】 前記遷移金属が、Cu (II) およびPd (II) の少なくとも一方である請求項9記載のクレアチニン測定用試験片。

【請求項11】 さらに、緩衝剤を含有する請求項1～10のいずれか一項に記載のクレアチニン測定用試験片。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、クレアチニンの測定に使用する試験片に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

臨床医療の分野において、腎機能の指標として優れることからクレアチニンの測定が行われている。

#### 【0003】

前記クレアチニンの測定方法としては、例えば、化学法や酵素法が一般的であり、前記化学法としては、例えば、クレアチニンがアルカリ条件下でピクリン酸と反応して、橙赤色に呈色する性質を利用したヤッフエ (Jaffe) 法 (例えば、非特許文献 1 参照。) や、ピクリン酸の代りに 3, 5-ジニトロ安息香酸を使用する Benedict・Behre 法 (例えば、非特許文献 2 参照。) 等が採用されている。一方、前記酵素法としては、クレアチニンに酵素を作用させてアンモニアを生成し、これを比色法で測定するクレアチニンデアミナーゼ法や、クレアチニナーゼでクレアチニンをクレアチンに変換し、このクレアチンをサルコシンオキシダーゼやペルオキシダーゼで処理し、比色法で測定するクレアチニンアミドヒドロラーゼ法 (クレアチニナーゼ法) (例えば、非特許文献 3 参照。) 等が採用されている。

#### 【0004】

##### 【非特許文献 1】

ボンズネスおよびタウスキー (Bonsnes and Taussky)、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー (J. Biol. Chem)、1945年、158、p.581

##### 【非特許文献 2】

ベネディクトおよびベール (Benedict and Behre)、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー (J. Biol. Chem)、1936年、113、p.515

##### 【非特許文献 3】

タンガネッラ (Tanganelli et al.)、クリニカルケミストリー (Clin. Chem)、1982年、28、p.1461

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

前記ヤッフエ法や Benedict 法は、化学的縮合反応を用いているため、使用する試薬コストは非常に安い。しかし、その反応が、反応温度を、例えば、35℃以上に上げなければ反応し難いことから、高温で長時間（例えば、10分以上）の反応を必要とする。さらに、強アルカリ条件（pH 11以上）で反応させるために、強アルカリ試薬を使用するので、測定のために特別な装置や治具等が必要となり、測定後の廃液処理も大きな問題であった。

#### 【0006】

一方、前記酵素法は、前述の化学法に比べて、例えば、中性付近の温和な条件で反応が進み、クレアチニンに対する特異性も高く、化学法の欠点の大部分が解決されている。しかし、例えば、使用する酵素の価格が非常に高く、また、使用する酵素の種類も多いために、試薬コストが高く、微量測定ができる特殊な施設以外での測定が困難な状況にある。

#### 【0007】

特に近年においては、生活習慣病である糖尿病が世界的に増加しており、これに伴って、その合併症の一つである糖尿病性腎症や、ひいては重篤な腎不全が増加している。このような疾患に対しては、例えば、腎透析や腎移植が必要となるという問題がある。したがって、このような腎症、特に糖尿病性腎症を、早期に防止するためにも、腎機能の指標であるクレアチニンを、安全で、しかも迅速かつ簡便に測定する新たな測定方法が望まれている。

#### 【0008】

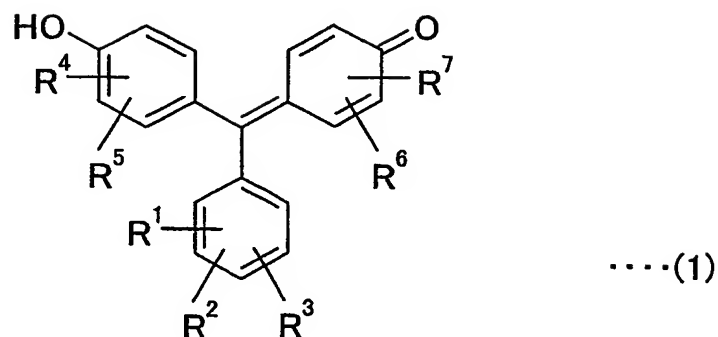
そこで、本発明の目的は、クレアチニン測定に使用する試験片の提供である。

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するために、本発明のクレアチニン測定用試験片は、下記式（1）で表わされる化合物を含むクレアチニン測定用試験片である。

## 【化 8】



前記式 (1) において、 $R^1$ は、 $H$ 、 $SO_3X$ 、 $COOX$ であって、 $R^4$ および  $R^6$ は、 $OH$ 、 $SO_3X$ 、 $COOX$ であり、それぞれ同一であっても異なってもよく、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ および  $R^7$ は、 $H$ 、 $OH$ 、 $Cl$ 、 $Br$ 、 $I$ 、 $NO_2$ 、 $NO$ 、 $CH_3$ であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記  $R^1$ 、 $R^4$  および  $R^6$ における  $X$ が、 $H$ 、 $Na$ 、 $K$ 、 $NH_4$ であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。

## 【0010】

本発明者は、クレアチニンの新たな測定方法を開発すべく、錯体生成剤と金属との呈色錯体生成反応において、クレアチニンの共存により、競合的に錯体生成反応をおこさせ、前記呈色錯体の退色を利用して、クレアチニン量を測定することを試みた。この結果、前記式に表わされる化合物によれば、クレアチニン非存在の場合は遷移金属との呈色錯体を形成するが、クレアチニンが存在すると、クレアチニンによって前記呈色錯体の形成が阻害され、クレアチニンと前記遷移金属とが非呈色錯体を形成することを、本発明者が初めて見出したのである。したがって、このような化合物を含有させた本発明のクレアチニン測定用試験片によれば、例えば、前記呈色錯体の形成の有無や程度を測定することによって、クレアチニンによる前記呈色錯体の形成阻害の程度がわかり、これによって試料中のクレアチニン量を求めることが可能になる。また、本発明の測定用試験片を用いた測定は、例えば、室温での反応が可能であることから、従来の酵素法のように、酵素の至適温度に温度を調節する必要もなく、かつ短時間での反応が可能であることから、迅速かつ容易に行うことができる。このため、腎機能の指標として

のクレアチニンの測定方法として、臨床医療の分野等に有用である。

# 【0011】

本発明のクレアチニン測定用試験片は、多孔質材が、前記化合物を含有する試験片である。前述のように前記化合物によれば、容易にクレアチニン量を求めることができるため、このような試験片であれば、より一層簡便な測定が可能となり、臨床医療の分野等において有用である。

# 【0012】

## 【発明の実施の形態】

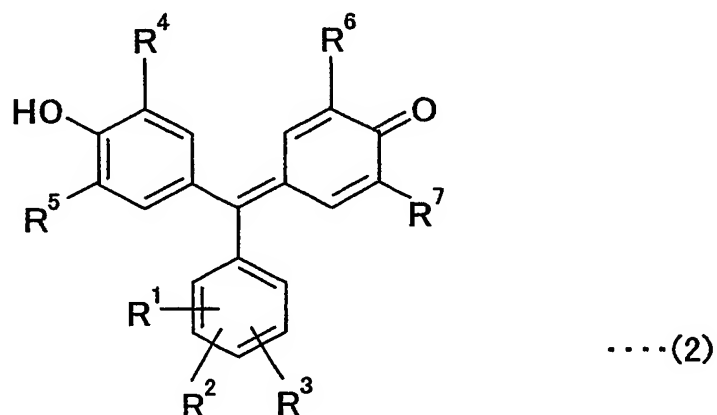
本発明のクレアチニン測定用試験片は、前述のように前記式(1)で表わされる化合物を含む試験片である。

# 【0013】

前記化合物としては、例えば、下記式(2)で表わされる化合物が好ましく、より好ましくは下記式(3)で表わされる化合物であり、特に好ましくは下記式(4)で表わされる化合物である。これらの化合物は水溶性であるため、例えば、液体試料等のクレアチニンを測定する場合、反応し易く、より一層優れた感度での測定が可能になる。

# 【0014】

## 【化9】

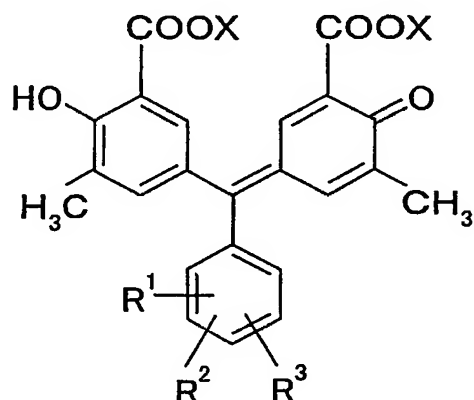


前記式(2)において、 $R^1$ は、H、 $SO_3X$ 、 $COOX$ であって、 $R^4$ および  $R^6$ は、OH、 $SO_3RX$ 、 $COOX$ であり、それぞれ同一であっても異なっているとしてもよく、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ および  $R^7$ は、H、OH、Cl、Br、I、 $NO_2$ 、N

O、CH<sub>3</sub>であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記R<sup>1</sup>、R<sup>4</sup>およびR<sup>6</sup>におけるXが、H、Na、K、NH<sub>4</sub>であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。

【0015】

【化10】



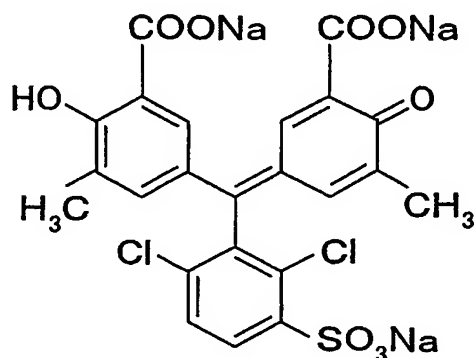
....(3)

前記式(3)において、R<sup>1</sup>は、H、SO<sub>3</sub>X、COOXであって、R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>は、H、OH、Cl、Br、I、NO<sub>2</sub>、NO、CH<sub>3</sub>であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、Xが、H、Na、K、NH<sub>4</sub>であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。

【0016】

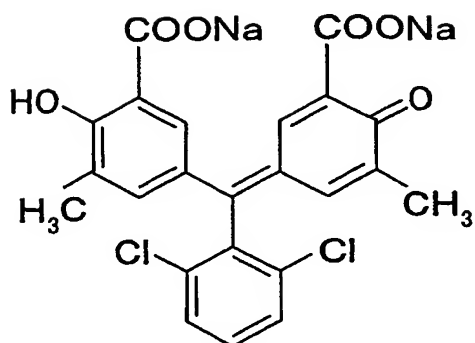
このような化合物の中でも、下記式(4)～(7)で表わされる化合物が好ましい。

【化11】



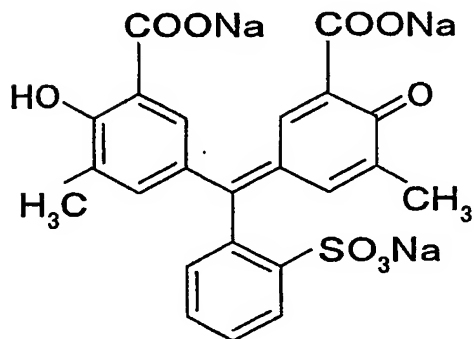
....(4)

【化12】



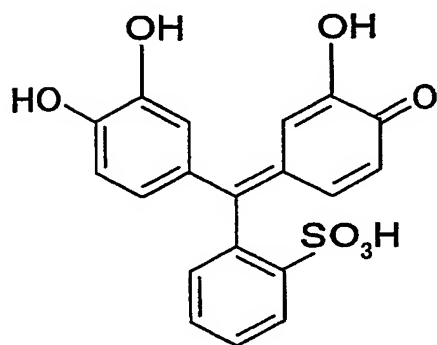
.....(5)

【化13】



.....(6)

【化14】



.....(7)

【0017】

なお、前記式(4)の化合物名は、2,6-ジクロロ-4'-ヒドロキシ-3',3''-ジメチル-3-スルホフクソン-5',5''-ジカルボン酸三ナトリウム塩(以下「クロマズロールS (Chromazurol S)」)という)であり、前記式(5)の化合物名は、2,6-ジクロロ-4'-ヒドロキシ-3',3''-ジメチルフクソン-5',5''-ジカル

ボン酸二ナトリウム塩（以下「クロマズロール B (Chromazurol B)」という）であり、前記式（6）の化合物名は、クロモキサンシアニン R（以下「エリオクロムシアニン R (Eriochrome Cyanine R)」という）であり、前記式（7）の化合物名は、ピロカテコールスルホンフタレイン（以下「ピロカテコールバイオレット (Pyrocatechol violet)」という）である。

#### 【0018】

前記各化合物の製造方法は、特に制限されず、従来公知の合成方法によって製造してもよい。また、前記クロマズロール Sは、例えば、商品名Chrome Azurol S（ナカライ社製）が、前記クロマズロール Bは、例えば、商品名Chromazurol B（同仁化学社製）が、前記エリクロムシアニン Rは、例えば、商品名Eriochrome Cyanine R（ナカライ社製）が、前記ピロカテコールバイオレットは、例えば、商品名Pyrocatechol violet（同仁化学社製）が使用できる。

#### 【0019】

本発明において、前記多孔質材は、さらに前記化合物と呈色錯体を形成する金属またはその塩（以下、「金属」ともいう）を含有することが好ましい。

#### 【0020】

前記金属としては、例えば、遷移金属またはこれらの塩が好ましく、前記遷移金属としては、例えば、Cu (II)、Pd (II)、U (VI)、Zr (IV)、Ti (IV)、Mn (II)、Fe (III)、Co (II)、Ni (II)、Mo (VI)、Sn (IV) 等またはこれらの塩があげられ、この中でも好ましくはCu (II)、Pd (II) であり、より好ましくはPd (II) である。また、これらの塩としては、ハロゲン化物、硫酸塩のような水溶性の高いものが好ましい。

#### 【0021】

前記化合物と金属との組み合わせとしては、例えば、クロマズロール SとPd (II)との組み合わせ、クロマズロール BとPd (II)との組み合わせ、エリオクロムシアニン RとCu (II)との組み合わせ、ピロカテコールバイオレットとCu (II)との組み合わせ等があげられ、この中でも好ましくは、クロマズロール SとPd (II)との組み合わせである。

#### 【0022】

本発明において、さらに緩衝剤を含有することが好ましい。前記緩衝剤としては、例えば、リン酸塩、ホウ酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、トリスヒドロキシメチルアミノメタン等が使用でき、好ましくは、リン酸塩、ホウ酸塩、酢酸塩であり、より好ましくはリン酸塩である。

#### 【0023】

本発明において、例えば、前記式(1)に表わされる化合物と金属とから形成される呈色錯体の安定性を制御できることから、前記試験片は、さらに、界面活性剤を含有することが好ましい。つまり、界面活性剤の存在によって、前記呈色錯体の安定性を調整できるということは、クレアチニンが存在する場合に、金属と前記化合物との呈色錯体形成よりも、金属とクレアチニンとが錯体を形成する競合反応を起し易くなるため、金属とクレアチニンとの反応性を向上できるということである。このため、クレアチニンの測定をより一層精度良く行うことができる。

#### 【0024】

前記界面活性剤としては、特に制限されないが、例えば、ノニオン系界面活性剤、アニオン系界面活性剤、およびカチオン系界面活性剤等が使用でき、これらは一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

#### 【0025】

前記ノニオン系界面活性剤としては、例えば、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルピロリドン(PVP)、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、Triton系、Tween系、Brij系等が使用でき、この中でも好ましくはPVA、Triton-X100、ポリエチレングリコールであり、より好ましくはポリエチレングリコールである。

#### 【0026】

前記アニオン系界面活性剤としては、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム等が使用でき、この中でも好ましくはSDS、コール酸ナトリウムであり、より好ましくはSDSである。

#### 【0027】

前記カチオン系界面活性剤としては、例えば、臭化ベンジルトリメチルアンモニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、塩化ベンザルコニウム、ゼフィラミン等が使用でき、この中でも好ましくは臭化ベンジルトリメチルアンモニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウムであり、より好ましくは臭化ベンジルトリメチルアンモニウムである。

#### 【0028】

前述のように界面活性剤は、いずれか一種類でもよいが、二種以上を併用してもよい。その組み合わせとしては、例えば、ノニオン系とアニオン系との組み合わせ、具体的にはPVAとSDSの組み合わせ、ポリエチレングリコールとコール酸ナトリウムとの組み合わせ、Triton-X100とSDSとの組み合わせ等があげられる。また、ノニオン系とカチオン系との組み合わせとしては、例えば、ポリエチレングリコールと臭化ベンジルトリメチルアンモニウムとの組み合わせ、PVPと臭化セチルトリメチルアンモニウムとの組み合わせ等があげられる。

#### 【0029】

また、界面活性剤は、例えば、前述のように前記式(1)の化合物と金属とから形成される呈色錯体の安定性や、発色性に影響するため、前記化合物および金属の種類に応じて適宜決定することが好ましい。

#### 【0030】

また、本発明の試験片において、前記多孔質材の種類は、特に制限されず、例えば、ろ紙、ガラスフィルター、樹脂製の多孔質膜等の多孔質材が使用できる。このなかで、コストや取り扱い性等の理由から、濾紙が好ましい。また、前記樹脂製多孔質膜の材料としては、例えば、ポリスルホン、ポリエステル、ナイロン、ニトロセルロース、ポリカーボネート等があげられる。そして、この多孔質材の平均孔径は、例えば、液体試料が浸透し、保持されればよく、例えば、3～10  $\mu\text{m}$ の範囲である。

#### 【0031】

(実施形態1)

つぎに、本発明について、前記多孔質材に、前記式(1)の化合物、前記金属

および緩衝剤を含有させた試験片の一例を示す。

#### 【0032】

前記多孔質材における各種試薬の含有量は、特に制限されず、試料の量等によって適宜決定できる。具体的な例としては、前記多孔質材の体積  $1\text{ cm}^3$  当たり、例えば、前記化合物が  $3 \times 10^{-3} \sim 1.5\text{ }\mu\text{mol}$  の範囲、金属が  $6 \times 10^{-3} \sim 0.9\text{ }\mu\text{mol}$  の範囲、緩衝剤が  $9 \sim 45\text{ }\mu\text{mol}$  の範囲であり、好ましくは、前記化合物が  $0.03 \sim 0.9\text{ }\mu\text{mol}$  の範囲、金属が  $0.06 \sim 0.45\text{ }\mu\text{mol}$  の範囲、緩衝剤が  $12 \sim 30\text{ }\mu\text{mol}$  の範囲の範囲である。なお、前記多孔質材  $1\text{ cm}^3$  当たりに添加する試料の体積は、通常、 $20 \sim 40\text{ }\mu\text{l}$  の範囲である。

#### 【0033】

また、さらに界面活性剤を含有する場合は、前記多孔質材の体積  $1\text{ cm}^3$  当たり、例えば、 $3 \sim 600\text{ }\mu\text{g}$  の範囲であり、好ましくは  $30 \sim 300\text{ }\mu\text{g}$  の範囲である。

#### 【0034】

このような試験片は、例えば、前記各種試薬を混合した溶液を準備して、前記溶液を前記多孔質材に含浸させ、乾燥することによって調製できる。なお、前記混合溶液の pH は、前記緩衝剤の種類等によって調製でき、例えば、pH  $5 \sim 9$  の範囲であることが好ましく、より好ましくは  $6 \sim 8$  の範囲である。このように中性付近に設定できるため、例えば、塩基性物質や酸性物質を含有させる試験片とは異なり、多孔質材が損傷を受けることを防止できる。このため、安定性にも優れた試験片となる。

#### 【0035】

前記混合溶液における各種試薬の濃度は、例えば、前記多孔質材に保持させる前記各種試薬の設定量に応じて決定できる。例えば、前記化合物が  $0.1 \sim 50\text{ mmol/L}$  の範囲、金属が  $0.2 \sim 30\text{ mmol/L}$  の範囲、緩衝剤が  $0.3 \sim 1.5\text{ mol/L}$  の範囲であり、好ましくは、前記化合物が  $1 \sim 30\text{ mmol/L}$  の範囲、金属が  $2 \sim 15\text{ mmol/L}$  の範囲、緩衝剤が  $0.4 \sim 1\text{ mol/L}$  の範囲である。また、さらに界面活性剤を含有する場合は、例えば、 $0.01$

～2重量%の範囲であり、好ましくは0.1～1重量%の範囲である。なお、前記多孔質材に対する前記混合溶液の含浸および乾燥を繰り返し、保持させる量を調整してもよい。

#### 【0036】

前記混合溶液の溶媒としては、特に制限されないが、水、緩衝液等が使用できるが、前述のように試薬として緩衝剤を含むため、前記緩衝剤を含む緩衝液を溶媒とすることが好ましい。また、例えば、エタノール、メタノール、アセトン等の有機溶媒を含むことも好ましい。

#### 【0037】

なお、予め、前記化合物と金属とを混合した場合、前記両者が反応して呈色錯体が形成されるが、前記混合溶液を多孔質材に含浸させても、クレアチニン含有試料を添加することによる、クレアチニンと金属との錯体形成には問題はない。なぜなら、クレアチニンは、前記両者の呈色錯体の形成阻害のみならず、すでに呈色錯体が形成されていても、この呈色錯体から前記金属を奪い、前記金属と錯体を形成する能力を有すると推測されるからである。

#### 【0038】

前述のように、前記混合溶液において、前記化合物と金属とが呈色錯体を形成しても、クレアチニンと金属との錯体形成には影響ない。しかし、予め呈色錯体が形成されることを抑制する場合には、例えば、前記化合物を含む溶液と、金属および緩衝剤を含む溶液を調製し、前記多孔質材への含浸および乾燥を、各溶液についてそれぞれ行えばよい。具体的には、例えば、クレアチニン測定用化合物を、金属が溶解し難い有機溶媒に溶解し、一方、金属と緩衝剤を水に溶解して水溶液を調製する。そして、前記水溶液を含浸乾燥させた後、前記有機溶媒のクレアチニン測定用化合物溶液を含浸させる。そうすれば、前記化合物と金属とが反応することなく、多孔質材中へ保持させることができる。

#### 【0039】

また、取扱性に優れることから、各種試薬を含有する前記多孔質材を、支持体上に積層してもよい。この場合、前記支持体の材料としては、特に制限されないが、例えば、透明樹脂等が好ましい。

**【0040】**

つぎに、前記試験片を用いて、液体試料のクレアチニン量を測定する一例を説明する。

**【0041】**

まず、前記試験片に前記液体試料を滴下して、一定時間反応させる。前記液体試料は、前記多孔質材内部に浸透し、これによって、前記多孔質材中の前記化合物と金属とが接触し、呈色錯体を形成する。一方、前記液体試料にクレアチニンが含まれる場合には、前記クレアチニンが、前記呈色錯体の形成を阻害する。このように、前記液体試料におけるクレアチニンの有無および含有量に応じて、多孔質膜内部における前記呈色錯体の形成量は異なるため、この呈色錯体の形成の程度が、すなわちクレアチニンの有無または含有量を示すことになるのである。

**【0042】**

前記反応条件は、特に限定されないが、例えば、反応温度は、10～40℃の範囲が好ましく、より好ましくは20～35℃の範囲であり、反応時間は、30秒～5分の範囲が好ましく、より好ましくは1～3分の範囲である。なお、室温以上の温度で反応させる場合は、測定前に、試料をさらに室温に放置しておくことが好ましい。

**【0043】**

前記反応を行った後、前記呈色錯体の形成の程度、すなわち、クレアチニンによる前記呈色錯体の形成阻害の程度を測定する。これは、例えば、前記試験片を光学的に測定することによって行うことができる。一方、予め、既知濃度のクレアチニン標準溶液について、本発明の試験片により、同様にして光学的測定を行い、前記測定値とクレアチニン濃度とをプロットすることによって検量線を作成しておく。そして、前記液体試料についての測定値を前記検量線に代入することによって、試料のクレアチニン濃度を求めることができる。

**【0044】**

前記試験片の光学的な測定方法としては、例えば、反射率の測定や吸光度の測定があげられる。

**【0045】**

前記反射率や吸光度の測定波長は、前記化合物と金属とから形成される呈色錯体の種類によって異なるため、例えば、使用する化合物と金属との組み合わせによって適宜決定できる。例えば、クロマズロール S と Pd (II) との組み合わせ、クロマズロール B と Pd (II) との組み合わせ、エリオクロムシアニン R と Cu (II) との組み合わせ、または、ピロカテコールバイオレットと Cu (II) との組み合わせの場合、測定波長は、560～700 nm の範囲が好ましく、より好ましくは 600～670 nm、特に好ましくは 620～650 nm の範囲である。

#### 【0046】

##### 【実施例】

つぎに、実施例について比較例と併せて説明する。

#### 【0047】

(実施例 1～3)

下記組成 1 の混合液 50 mL、組成 2 の混合液 50 mL および組成 3 の混合液 50 mL を調製し、各混合液にろ紙（厚み 340 mm、商品名 Whatman 3 MMC hr：ワットマン社製）を含浸させた。前記ろ紙を 50℃ で約 10 分間乾燥した後、長さ 5 mm×幅 5 mm に裁断し、PET フィルム上に両面テープで貼り付け、これを試験片とした。組成 1 の混合液を含浸させた試験片を実施例 1 とし、組成 2 の混合液を含浸させた試験片を実施例 2 とし、組成 3 の混合液を含浸させた試験片を実施例 3 とした。なお、前記化合物として、前記式 (6) に示す商品名 Eriochrome Cyanine R（ナカライ社製）、前記式 (4) に示す商品名 Chrome Azurol S（ナカライ社製）、前記式 (5) に示す商品名 Chromazurol B（同仁化学社製）を使用した。

#### 【0048】

(混合液組成 1)

ホウ酸緩衝液 (pH 9.0)	0.5 M
硫酸銅 (II)	3.0 mM
Eriochrome Cyanine R	6.0 mM

#### 【0049】

## (混合液組成 2)

クエン酸緩衝液 (pH 7. 0)	0. 5 M
塩化パラジウム	8 mM
Chromazurol S	1 5 mM
ポリエチレングリコール	0. 5 重量%

## 【 0 0 5 0 】

## (混合液組成 3)

ホウ酸緩衝液 (pH 9. 0)	0. 5 M
塩化銅(II)	3. 0 mM
Chromazurol B	3. 0 mM
ポリエチレングリコール	0. 1 重量%

## 【 0 0 5 1 】

## (クレアチニンの測定)

生理食塩水、生理食塩水にクレアチニン（ナカライ社製）を溶解したクレアチニン溶液（50、100および200mg/100mL）を、測定試料として準備した。そして、作製した実施例1～3の前記試験片を、前記各測定試料にそれぞれ約2秒間浸漬した後、引き上げて、室温で1分間放置した。そして、これらの試験片について、色差計（商品名Σ90；村上色彩技術研究所製）を用いて、630nmにおける反射率（単位%）を測定した。これらの結果を下記表1および図1に示す。図1は、クレアチニン濃度と反射率の相関関係を示すグラフである。

## 【 0 0 5 2 】

## (表1)

クレアチニン濃度	反射率（単位；%）		
	実施例 1	実施例 2	実施例 3
0mg/100mL	23. 3	7. 9	42. 8
50mg/100mL	32. 0	16. 6	47. 7
100mg/100mL	36. 7	25. 5	54. 1
200mg/100mL	45. 6	39. 4	64. 2

## 【0053】

前記表1および図1に示すように、各実施例におけるクレアチニン濃度と反射率との相関式は、実施例1「 $y = 0.107x + 25$ （相関係数  $r = 0.986$ ）」、実施例2「 $y = 0.157x + 8.6$ （相関係数  $r = 0.998$ ）」、実施例3「 $y = 0.108x + 43$ （相関係数  $r = 0.999$ ）」であった。このことから、クレアチニン濃度と、実施例の試験による反射率とは良好な相関関係が確認できた。

## 【0054】

（実施例4）

測定試料として尿検体を20検体準備し、予め、ヤッフエ法の定量試薬（商品名クレアチニン-HA テストワコー；和光純薬社製）と商品名日立7070型自動分析装置（日立製作所製）とを用いてクレアチニン濃度を測定した。次に、実施例2の前記試験片を、前記測定試料に約2秒間浸漬した後、引き上げて、室温で1分間放置した。そして、これらの試験片について、色差計（商品名Σ90；村上色彩技術研究所製）を用いて、630nmにおける反射率（単位%）を測定した。

## 【0055】

前記各測定試料についての前記ヤッフエ法によるクレアチニン濃度測定の結果と実施例2の前記試験片を用いた反射率測定の結果を、下記表2および図2に示す。図2において、x軸は、前記自動分析装置による各測定試料のクレアチニン濃度（mg/100ml）を示し、y軸は、実施例2の前記試験片による各測定試料の反射率（%）を示す。

## 【0056】

【表2】

検体 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
jaffe 法による濃度 (mg/100mg)	15	30	38	39	44	49	52	56	67	73
試験片による反射率 (%)	7.3	9.7	14.3	11.1	18.8	20.0	14.6	23.1	19.3	25.4
検体 No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
jaffe 法による濃度 (mg/100mg)	74	81	83	91	100	116	123	151	163	165
試験片による反射率 (%)	27.2	18.4	25.8	30.4	28.2	30.6	34.6	37.7	36.9	37.6

## 【0057】

前記表2および図2に示すように、各測定試料における前記ヤッフエ法で測定されたクレアチニン濃度と、実施例2の前記試験片から得られた反射率との関係は、相関式「 $y = 0.201x + 7.4$ （相関係数  $r = 0.938$ ）」で表される良好な相関関係であることが確認された。

## 【0058】

## 【発明の効果】

以上のように、本発明のクレアチニン測定方法は、本発明のクレアチニン測定用化合物を用いた新たな測定方法であり、クレアチニンによる呈色錯体の生成阻害を利用して容易にクレアチニン量を測定することができる。このため、本発明の測定方法は、前述のような臨床医療等において、腎機能の指標としてのクレアチニン測定に有用である。

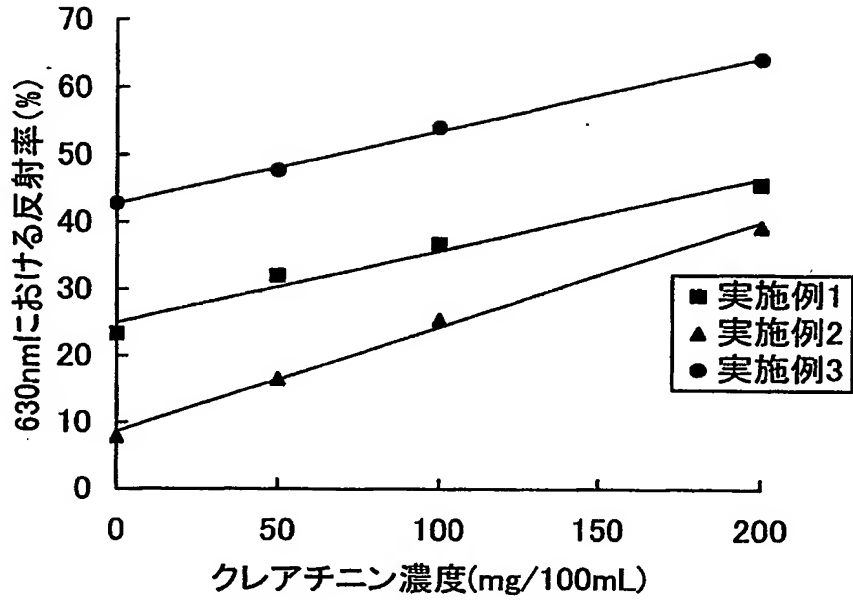
## 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の実施例における、クレアチニン濃度と反射率との関係を示すグラフである。

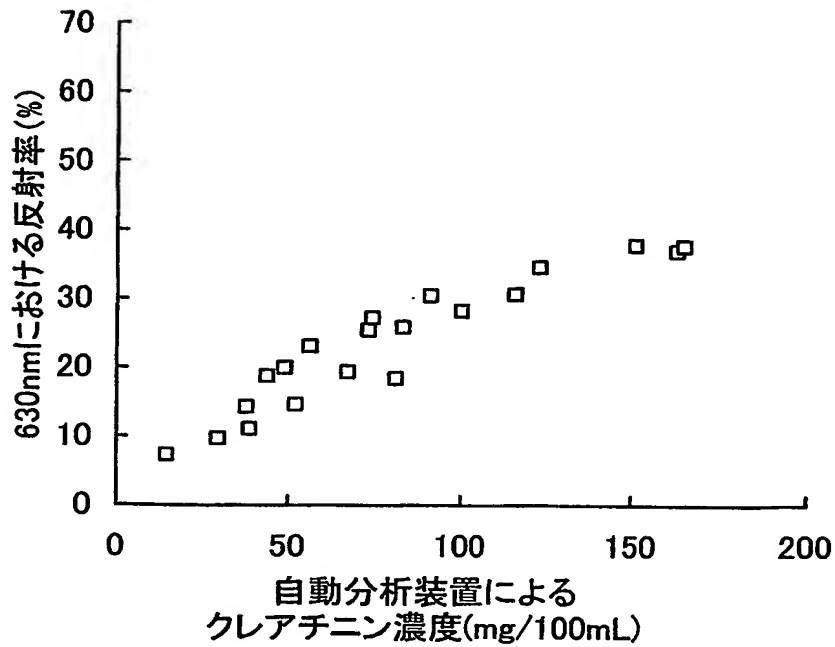
【図2】 本発明の実施例における、クレアチニン濃度と反射率との関係を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



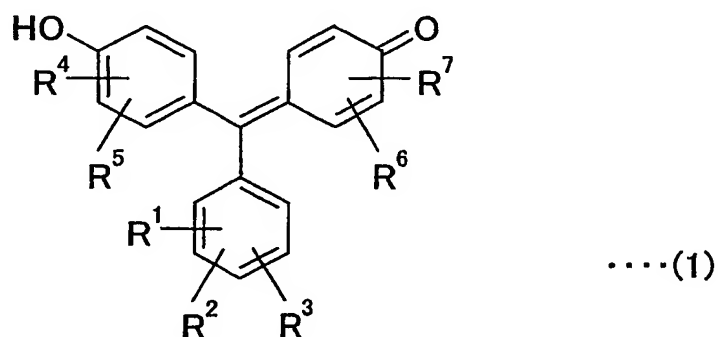
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 クレアチニンの新たな測定用試験片を提供する。

【解決手段】 多孔質材に、下記式(1)の化合物、前記化合物と呈色錯体を形成する金属および緩衝剤を含有させ、前記化合物と前記金属とから形成される呈色錯体を光学的に測定し、クレアチニンによる前記呈色錯体の形成阻害の程度を測ることによって、クレアチニン量を測定する。下記式(1)において、 $R^1$ は、 $H$ 、 $SO_3X$ 、 $COOX$ であって、 $R^4$ および $R^6$ は、 $OH$ 、 $SO_3X$ 、 $COOX$ であり、それぞれ同一であっても異なってもよく、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ および $R^7$ は、 $H$ 、 $OH$ 、 $Cl$ 、 $Br$ 、 $I$ 、 $NO_2$ 、 $NO$ 、 $CH_3$ であって、それぞれ同一であっても異なってもよく、前記 $R^1$ 、 $R^4$ および $R^6$ における $X$ が、 $H$ 、 $Na$ 、 $K$ 、 $NH_4$ であって、それぞれ同一であっても異なってもよい。

【化1】



【選択図】 図1

特願 2 0 0 2 - 3 0 0 9 5 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 4 1 8 9 7 ]

1. 変更年月日  
[変更理由]

2 0 0 0 年 6 月 1 2 日

名称変更

住 所  
氏 名

京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地  
アークレイ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**